


**JP3192401B2**

**Patent number:** JP3192401B2  
**Publication date:**  
**Inventor:**  
**Applicant:**  
**Classification:**  
- international:  
- european:  
**Application number:**  
**Priority number(s):**

**Also published as:**

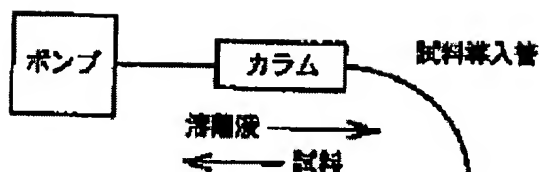
 JP10332658 (A)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP3192401B2

Abstract of corresponding document: **JP10332658**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method in which an adsorbate can be separated from an eluate many numbers of times by a method wherein a liquid sample is introduced into a separating implement from a direction opposite to its diluting direction, impurities are eluted completely from an object to be measured, the other is adsorbed by an adsorbent and the adsorbate is separated and eluted from the eluate. **SOLUTION:** The pressure at the inside of a column is decreased by a pump, a liquid sample is sucked from a sample introduction pipe in a direction opposite to its eluting direction, and the sample is adsorbed by an adsorbent almost totally. Then, an eluate which is adapted to the adsorbent is made to flow to the eluting direction, the eluate is introduced into the column, the inside of the column is pressurized by the pump, and the eluate is eluted from an eluting tip together with the liquid sample. When impurities are separated, an adsorbent which adsorbs the whole or the greater part of an object to be measured is used, the liquid sample is sucked from the eluting tip, an eluate which does not elute the adsorbed sample to be measured is sucked from the eluting tip so as to be pressurized, the eluate is made to flow to the eluting direction, and the greater part of an undissolved substance is removed. Then, an eluate which elutes the sample to be measured is sucked from the eluting tip so as to be pressurized, the eluate is made to flow to the eluting direction, and the object to be measured is extracted.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

• •  
• • • •

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-332658

(43) 公開日 平成10年(1998)12月18日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 30/40  
30/00G 0 1 N 30/40  
30/00

E

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平10-73796

(22) 出願日 平成10年(1998) 3 月23日

(31) 優先権主張番号 特願平9-81760

(32) 優先日 平 9 (1997) 4 月 1 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 2 号

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

(72) 発明者 中村 賢治

兵庫県尼崎市高田町 6 - 1 和光純薬工業  
株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 里村 慎二

兵庫県尼崎市高田町 6 - 1 和光純薬工業  
株式会社大阪研究所内

(74) 代理人 弁理士 稲垣 仁義

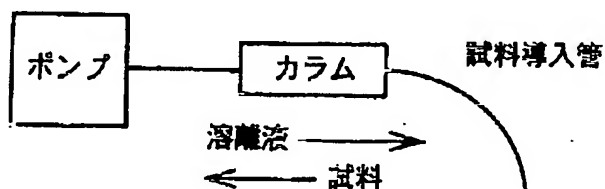
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液体試料成分の分離方法及び該方法に使用する装置

## (57) 【要約】

【課題】試料導入部を洗浄液で洗浄しなくともキャリーオーバーが避けられると共に、多数の液体試料を同一の分離容器を使用して多数回分離しても、カラムの圧力が上昇したり、分離が悪くなる現象を避けることができる液体試料成分の分離方法及び該方法に使用する分離装置を提供する。

【解決手段】液体試料を、吸着剤を保持した分離容器の溶出方向とは逆方向から分離容器に導入し、溶離液と共に溶出先端から分離溶出させることにより、微量の不溶物と試料導入路に付着した試料とを溶出操作によって除去できるので、キャリーオーバーとカラムが詰まることによりカラムの圧力が上昇したり、分離が悪くなる現象を回避し得るようにした。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】液体試料中の複数の成分を吸着剤に対する吸着力の差を利用して分離する方法において、前記液体試料を、吸着剤を保持した分離器具の溶出方向とは逆方向から分離器具に導入し、溶離液と共に溶出先端から分離溶出させることを特徴とする液体試料成分の分離方法。

【請求項2】前記液体試料を、前記分離器具に吸引して導入する請求項1に記載の分離方法。

【請求項3】前記溶離液を、前記分離器具の溶出方向とは逆方向から分離器具に吸引して導入する請求項1または2に記載の分離方法。

【請求項4】前記液体試料が、不溶物を含んだ試料である請求項1～3のいずれか1項に記載の分離方法。

【請求項5】前記液体試料に溶解している測定対象と測定に悪影響を与える不純物の一方の大部分は、他方が溶出する条件で前記吸着剤に吸着される請求項1～4のいずれか1項に記載の分離方法。

【請求項6】前記液体試料を吸引後、気体若しくは液体を吸引して、吸引流路に付着した液体試料を前記分離器具内に流入させる請求項2に記載の分離方法。

【請求項7】前記分離器具内を溶出方向に加圧して、前記吸着させた液体試料の分離溶出を行う請求項1～6のいずれか1項に記載の分離方法。

【請求項8】前記液体試料の吸着剤への吸着と溶出とを、同一の前記分離器具を使用し、別の液体試料について繰り返し行う請求項1～7のいずれか1項に記載の分離方法。

【請求項9】前記吸着剤を保持した分離器具が、吸着剤を充填したカラムである請求項1～8のいずれかに記載の分離方法。

【請求項10】前記吸着剤を保持した分離器具が、シート状若しくは膜状の吸着剤を、分離管内若しくは分離管に形成した外方に向けた膨出部内で保持した分離器具である請求項1～8のいずれかに記載の分離方法。

【請求項11】吸着剤を保持した分離器具と、該分離器具の一端の溶出側に位置する液体試料導入部と、前記分離器具の他端に接続された分離器具内を減圧または減圧及び加圧する手段とを具備したことを特徴とする液体試料中の成分を吸着剤に対する吸着力の差を利用して分離する装置。

【請求項12】前記分離器具内を減圧または減圧及び加圧する手段が、分離器具内にエアを吸引し得、且つ該エアを吐出し得るポンプである請求項11に記載の装置。

【請求項13】前記ポンプにかかる負荷が、 $30\text{ kg f/cm}^2$ 以下となるように前記吸着剤を選択する請求項12に記載の装置。

【請求項14】前記吸着剤を保持した分離器具が、吸着剤を充填したカラムである請求項11～13のいずれか

に記載の分離方法。

【請求項15】前記吸着剤を保持した分離器具が、シート状若しくは膜状の吸着剤を、分離管内若しくは分離管に形成した外方に向けた膨出部内で保持した分離器具である請求項11～14のいずれかに記載の装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、液体試料中の複数の成分を吸着剤に対する吸着力の差を利用して分離する方法及び該方法に使用する分離装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】液体試料中の複数の成分を吸着剤に対する吸着力の差を利用して分離する方法としては、一般にカラムクロマトグラフィーによる方法が知られている。この方法に於けるカラムへの一般的な試料の導入方法は、カラム担体の上に直接若しくは試料導入装置（インジクター）を用いて試料を導入するものであり、これら試料の導入は、いずれも試料の溶出方向に対して、上流で行われるものである。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記方法は、カラム上流から試料を導入するため、同じカラムを血清のようなカラムを通過できない不溶物を含んだ試料の分離・分析にを繰り返し使用する場合、試料中の微量な不溶物がカラムに詰まるため、カラム内の圧力が上昇したり、分離が悪くなる現象が生じ、その結果カラム寿命が短くなる問題があった。そのため、一般的には、試料導入前に、汙過等の前処理を行って、不溶物を除去して分離を行っていたが、操作が繁雑となり、作業能率が上がらない問題があった。

【0004】そればかりか、試料導入装置を用いる場合は、試料導入装置内に微量な試料が残り、次に分析する試料を汚染する（キャリーオーバー）原因となるという問題があった。そのため、試料導入後、試料導入路を多量の洗浄液で繰り返し洗浄する必要があった。

【0005】この発明は、試料導入部を洗浄液で洗浄しなくともキャリーオーバーが避けられると共に、多数の液体試料を同一の分離器具を使用して多数回分離しても、分離器具内の圧力が上昇したり、分離が悪くなる現象を避けることができる液体試料成分の分離方法及び該方法に使用する分離装置を提供することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】上記目的に沿う本発明の分離方法は、液体試料中の複数の成分を吸着剤に対する吸着力の差を利用して分離する方法において、前記液体試料を、吸着剤を保持した分離器具の溶出方向とは逆方向から分離器具に導入して、測定対象物質と測定へ影響を与える不純物の何れかがほぼ完全に溶出される条件下で他方を吸着剤に吸着させ、次いで吸着された物質を溶離液と共に溶出先端から分離溶出させることを特徴とす

る。

【0007】また、本発明の分離装置は、吸着剤を保持した分離器具と、該分離器具の一端の溶出側に位置する液体試料導入部と、前記分離器具の他端に接続された分離器具内を減圧または減圧及び加圧する手段とを具備したことを特徴とする。

【0008】要するに本発明は、液体試料を溶出方向とは逆方向から分離器具に導入することによって、微量の不溶物が分離器具下端（溶出先端部）の吸着剤担持部に付着するので、不溶物は溶出当初に除去され、分離器具内に残存しないから、多数回分離操作を行っても分離器具内の圧力が上昇したり、分離が悪くなる現象を避けることができるようにすると共に、分離器具への試料導入路に導入した試料が残存していても、溶出操作によって除去できるから、キャリアオーバーを回避し得るようにしたことを要旨とするものである。

【0009】

【発明の実施の形態】次に、本発明の実施の形態を説明する。本発明方法においては、液体試料を分離器具に溶出方向とは逆方向から導入するため、液体試料中の不溶物は、溶離液を流すと、逆洗の原理によって、その大部分は最初に溶離液と共に溶出除去される。また、吸着剤に吸着された成分は、吸着力の差によって分離される。

【0010】本発明に使用する吸着剤としては、測定対象Aと測定に悪影響を与える不純物B（複数であっても良い）に対して吸着力の差の大きいものを使用するのが良い。例えば、前記測定対象Aと不純物Bとを分離する場合、ある条件で、測定可能な量以上のAを吸着し溶出するが、測定に影響を与えない量以下のBしか吸着し溶出させない吸着剤や、Aについては上記と同じであるが、Bについては測定に影響を与えない量より多く吸着しても、測定に影響を与えない量以下しか溶出させない吸着剤、Aについては殆ど吸着しないが、Bについてはその殆どを吸着し且つ測定に影響を与えない量以下しか溶出させない吸着剤を選択すれば良い。測定に悪影響を与えない不純物B'については、測定対象Aと分離できてもできなくとも差し支えない。

【0011】本発明に最も効果的なのは、測定対象と不純物の一方は、他方が溶出される条件でほぼ完全に吸着されるような吸着剤を選択することである。これは、例えば下記の如き性質を有するものが挙げられ、ほぼ完全に吸着された成分は、下記のように吸着の種類に応じて溶出させれば良い。この場合、測定対象と不純物のどちらを吸着させるようにしても良いが、不純物には一般に種々の成分が含まれるので、測定対象を吸着させるのが良い。

【0012】（イオン交換）イオンの差がある物質間の分離に用いられる。この場合、吸着された物質の溶出は、溶離液のイオン性を変える（塩濃度を上げる）か、pHを変える等の方法で行えば良い。

（疎水吸着）疎水的に差がある物質間の分離である。吸着された物質の溶出は、溶離液の疎水性を下げる（塩濃度を下げる、例えばメタノール、エタノール、アセトニトリル等の有機溶媒を添加する）ことにより行う。

【0013】（特異的な親和性）抗原抗体反応、基質と酵素、レセプターとレセプター反応物質（例えばホルモン）、レクチンと糖鎖、アビジン（ストレプトアビジン）とビオチン、等のアフ ニテークロマトグラフィーに使用されている特異的な吸着をする物質を使用する分離に用いられる。この場合の吸着された物質の溶出は、特異的な吸着の結合を解離させる公知の方法で行えば良い。

【0014】本発明に使用する吸着剤は、好ましくは、上記イオン交換、疎水吸着または特異的な親和性によって吸着し得る吸着剤、例えば、イオン交換樹脂、疎水担体、ハイドロキシアパタイト、プロテインA等が固定化されたアフ ニテ ー担体等が挙げられる。また、吸着剤の層の厚さも特に厚くしなくとも良く、イオン交換能等を付与した膜や濾紙等を使用することもできる。

【0015】液体試料として例えば血清、尿等を使用する場合は、分離を向上させるため、溶媒の役割をする緩衝液等の試液で希釈してから、分離器具に導入すると良い。尚、このような目的で使用する緩衝液としては、この分野で通常用いられているものを使用すれば良い。この場合、測定対象に対する抗体を添加すると、“測定対象”が“測定対象+抗体”の免疫複合体を形成するので、疎水性が変化し、疎水吸着によって分離し易くなる。更に、この抗体にイオン基を付加しておくで、“測定対象+抗体+イオン基”の免疫複合体を形成するので、イオン交換によって更に分離し易くなる。

【0016】更に、イオン基結合抗体とは別の抗体に標識を結合させ、この標識抗体とイオン基結合抗体とを測定対象に結合させると、測定対象にはイオン基と標識とが導入されることとなる。そして、標識として生体成分にないものを使用すれば、測定対象検出の特異性を向上させることができる。また、本発明方法によれば、生体成分中の測定対象を、遊離の標識抗体や測定対象中に含まれるかもしれない検出を妨げる物質から効果的に分離することができるので、測定の精度を向上させることができる。

【0017】図1は、本発明の分離方法に使用する分離装置の一実施例を示す概略図であり、分離器具であるカラムの溶出先端には、試料導入管が連結され、カラムの他端はパイプを介してカラム内を減圧及び加圧するポンプに連結されている。

【0018】本発明に使用する分離器具（分離管）は、試料導入口（溶出口）と、試料導入のために分離器具内を減圧（吸引）し得る開口部とを有し、内部に吸着剤を保持し得るものであれば良く、その形状及び材質は特に限定されない。即ち、例えばカラムクロマトグラフィー

に於いて通常用いられる、吸着剤を充填した円筒状の所謂カラムが一般的であるが、例えば、汙紙のようなシート状吸着材又は膜状の吸着剤を、分離管に形成した外方に向けた膨出部（例えば円盤状膨出部）内で保持した分離器具の一端に試料導入部を位置させ、他端に減圧手段を接続するか、大気と接する開口に形成しても良い。また、内部に膜状の吸着剤を保持した遠心汙過チューブ（日本ミリポアリミテッド社製等）等も勿論使用可能である。

【0019】分離器具は、通常溶出先端が下端になるように縦にして使用するが、測定対象と不純物の一方がほぼ完全に吸着される場合は、溶出先端が上端であっても横であっても差し支えない。分離器具の溶出先端から液体試料を導入するには、図1に示すように、ポンプにより、分離器具（カラム）内を減圧にして、液体試料を試料導入管から分離器具内に、溶出方向とは逆方向に吸引する。このまま溶離液を流しても、溶出先端及び試料導入管（試料導入路）は、溶離液で洗浄されるので、キャリーオーバーを回避し得る。

【0020】しかしながら、液体試料を吸引後、空気、純水若しくは溶離液等の液体若しくは気体を、好ましくは試料導入路の容量より多く吸引して、吸引流路内に付着した液体試料を分離管内に流入させる方が、測定感度が向上することから好ましい。即ち、試料導入後、試料導入口から分離器具内の吸着剤までの配管容量以上の気体若しくは液体を導入することによって、試料の殆ど全てを分離器具内の吸着剤に導入することができ、測定感度を向上させることができる。

【0021】使用する液体若しくは気体としては、分離及び測定に悪影響を与えないものであるなら良く、特に限定されない。分離器具のベット量以上の気体を吸入する場合は、気体の吸入により分離能が低下しない吸着剤を選ぶのが良い。液体を導入する場合は、試料の拡散を少なくするために、吸入速度の最適化等を行うと良い。

【0022】上記のようにして、試料を吸着剤に吸着させたら、分離器具の上流から溶出先端に向けて、即ち溶出方向に溶離液を流す。溶離液としては、吸着剤の種類に応じて、通常カラムクロマトグラフに使用されているものを使用すれば良い。溶離液は、分離器具の上流から、即ち図1の装置の場合は、ポンプとカラム（分離器具）との間のパイプに導入しても、試料導入管から導入しても良い。試料導入管から導入すれば、同時に、吸引流路に付着した試料を導入できることと、装置が簡略化される利点が生じる。

【0023】溶離液をカラム内に導入したら、ポンプでカラム内を加圧して、溶離液を試料成分と共に、溶出先端から直接若しくは試料導入管を通して溶出する。本発明に使用するポンプとしては、分離器具内にエアーを吸引し得、且つ該エアーを吐出できるものであれば良く、特に限定されない。

【0024】ポンプを使用する場合は、選択した条件において、ポンプの負荷が $30\text{ kgf/cm}^2$ 以下となるような吸着剤を選択すると良い。このような吸着剤を選択することによって、試料導入管からの試料の導入をスムーズに行うことができると共に、分離器具内を加圧することにより行う分離溶出をスムーズに行うことができる。

【0025】減圧及び加圧する手段としては、ポンプでなくとも良い。例えば、注射筒のように、外筒に棒状体を摺動し得るように密嵌させ、液体試料を吸引及び吐出し得るようにしても差し支えない。この場合、外筒は、分離器具自体であっても、分離器具とは別のものであっても差し支えない。また、ピペットのように、キャップを膨らませて吸引し、キャップを押しつぶして吐出するようにしても良い。本発明では、加圧手段は、必ずしも必要ではなく、吸引した状態で、上記減圧及び加圧手段を取り外し、大気圧下で吐出させるようにしても良い。

【0026】液体試料中の測定対象Aから測定に悪影響を与える不純物Bと不溶物とを分離する場合、例えば、次のようにして行うことができる。吸着剤として前記A（若しくはB）の全部若しくは大部分を吸着する吸着剤を使用し、液体試料を溶出先端から吸入後、吸着されたA（若しくはB）を溶出させない所定量の溶離液を溶出先端から吸入し、加圧して溶離液を溶出方向に流して、不溶物の大部分及びB（若しくはA）を除去する。ついで吸着されたA（若しくはB）を溶出させる所定量の溶離液を溶出先端から吸入し、加圧して溶離液を溶出方向に流して、吸着剤に吸着されているA（若しくはB）を溶出させて取り出すようにすれば良い。

【0027】Aと不溶物とを一緒に溶出させる場合は、溶出液を複数のフラクションに分けて、Aを分離しても良いし、溶出液を汙過してAを分離しても良い。上記のようにして吸着剤に吸着された成分は、全て洗浄除去されるので、上記分離器具を使用し、別の液体試料について、同様に上記操作を繰り返す行うことができる。

【0028】上記実施例では、溶離液を溶出先端から導入しているが、分離器具の上流から導入しても良い。上記実施例では、加圧して溶離液を溶出させているが、自然滴下のような常圧で行っても、溶出先端から吸引して溶出させても良い。

【0029】上記実施例では、溶出先端に試料導入管を接続しているが、溶出先端の形状により、直接試料が吸引できる場合は、試料導入管は使用しなくとも勿論良い。また、上記実施例では、減圧により液体試料を吸引し、その後、加圧して溶離液を溶出させている。分離器具の溶出先端を上方にして試料を導入し、ついで、溶出先端を下端にして上端から溶離液を注入し、滴下して常圧で実施することもできる。また、分離器具の溶出先端への液体試料の導入は、例えば注射器のような器具を用いて分離管の溶出先端へ液体試料を注入することによ

で行っても良い。分離が迅速にできることから、最初に述べた実施例のようにすることが好ましい。

【0030】本発明の方法及び装置に適用する試料としては、一般にカラムクロマトグラフに使用される液体試料であれば良いが、特に微量の不溶物を含む血清等の生体成分の分離に有用である。

【0031】

【実施例】次に、実施例及び比較例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。  
実施例1

(1) 使用した試薬類の調製

①抗体液

ペルオキシダーゼ標識抗 $\alpha$ -フ トプロテイン抗体Fab'フラグメント (Fab' -POD、和光純薬工業(株)製) 36.2 $\mu$ g/10ミリリットルと、Fab' -PODと違うエピトープを認識することを確認した抗 $\alpha$ -フ トプロテイン抗体に硫酸化チロシンペプチド [Ala-(Thy(SO<sub>3</sub>))<sub>8</sub>] を結合したFab' フラグメント (Fab' -YS8、和光純薬工業(株)製) 3.7 $\mu$ g/10ミリリットルとを含有する50mMN-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸緩衝液 (pH6.5) を調製し、これを抗体液とした。

【0032】②試料

$\alpha$ -フ トプロテイン (AFP、和光純薬工業(株)製) を、50mMN-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸緩衝液 (pH6.5) で希釈して、100ng/ミリリットルとなるように調製し、これを試料とした。

③基質液

32mM4-アセトアミドフ ノールと38mM過酸化水素とを含む10mMクエン酸緩衝液 (pH6.5) を調製し、これを基質液とした。

【0033】(2) 分析方法

上記抗体液100マイクロリットルと試料10マイクロリットルとを混合し、8℃で5分間反応させた。この混合液80マイクロリットルを、POROS-DEAEカラム (0.46×1cm、パーセプテブ社製) に、下記①～④の方法により導入した。ついで、50mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH8.0, 0.3M塩化ナトリウム含有) 10ミリリットルでカラムを洗浄後、50mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH8.0, 3M塩化ナトリウム含有) 3ミリリットルで、Fab' -POD、AFPとFab' -YS8の免疫複合体を溶出させた。得られた溶出液2ミリリットルに、上記基質液200マイクロリットルを加え、37℃で10分間反応させ、その蛍光強度を、励起波長328nm、蛍光波長432nmで測定した。得られた結果を図3に示す。尚、溶離液 (緩衝液) は、いずれもカラムのポンプ側から導入した。

【0034】(2) 試料の導入方法

①比較例

図2に示すように、ポンプ (シリンジポンプSIL10A、島津製作所製) に、インジェクター (Model 7125型、RHEODYNE社製)、POROS-DEAEカラム (分離器具) の順で結合させた装置を使用し、インジェクターによって試料80マイクロリットルをカラムに導入した。

②本発明方法-1)

図1に示すように、比較例と同じポンプにPOROS-DEAEカラムを直接結合し、カラム溶出出口に容量100マイクロリットルの試料導入管を結合した装置を使用した。試料導入管から試料80マイクロリットルをポンプで吸引した後、空気100マイクロリットルを吸引した。

【0035】③本発明方法-2)

上記②と同じ装置を使用し、試料導入管から試料80マイクロリットルをポンプで吸引した後、空気200マイクロリットルを吸引した。

④本発明方法-3)

上記②と同じ装置を使用し、試料導入管から試料80マイクロリットルをポンプで吸引した後、精製水200マイクロリットルを吸引した。

【0036】(3) 結果

図3から明らかなように、本発明方法-2) 及び-3) により得られた蛍光強度は、比較例と同等であるが、本発明方法-1) により得られた蛍光強度は、比較例よりも約10%程度低下した。このことから、試料導入後、導入路を十分に洗浄することにより、従来の方法と同等の測定感度が得られることが判る。

【0037】尚、データは示していないが、種々の濃度の $\alpha$ -フ トプロテイン溶液について、本発明方法-1)、-2) 及び-3) により蛍光強度を求めて、 $\alpha$ -フ トプロテイン濃度と蛍光強度との関係を表す検量線を作成したところ、何れの方法によっても良好な直線性を有する検量線が得られた。このことから、本発明方法-1) によっても、目的成分の分析を精度良く実施し得ることが判る。

【0038】実施例2

濁りが認められるヒト血漿検体試料100マイクロリットルを、実施例1と同じPOROS-DEAEカラムに下記の方法 (導入法1) 及び2) により導入し、導入毎にポンプで、50mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH8.0, 3M塩化ナトリウム含有) を、ポンプ側から導入して流速3ミリリットル/分でカラムに流し、カラムにかかる圧力を測定した。結果を図4に示す。

【0039】[導入法1)] (比較例)

図2に示すように、ポンプに、インジェクター、POROS-DEAEカラム (分離器具) の順で結合した実施例1で比較に使用した装置を使用し、インジェクターに



よって試料100マイクロリットルを導入し、50mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液（pH 8.0、3M塩化ナトリウム含有）を1ミリリットル吐出させた。

【0040】〔導入法2〕（本発明方法）

図1に示すように、ポンプにPOROS-DEAEカラムを直接結合し、カラム溶出出口に容量100マイクロリットルの試料導入管を結合した実施例1と同じ装置を使用した。試料導入管から試料100マイクロリットルをポンプで吸引し、更に精製水200マイクロリットルを吸引した後、ポンプで加圧して吸引方向とは逆方向に50mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液（pH 8.0、3M塩化ナトリウム含有）を1ミリリットル吐出させた。

【0041】図4より明らかなように、比較例の導入法1）（従来法）では導入回数が増えるに従って圧力が上昇するが、本発明方法の導入法2）では導入回数が増えても圧力の上昇はほとんど認められない。この結果から、本発明方法によれば、不溶物を含んだ試料でも直接カラム（分離器具）に導入でき、しかもカラムの寿命が著しく向上することがわかる。

【0042】実施例3

（1）抗体液、試料及び基質液  
実施例1と同じ。

（2）洗浄液及び溶離液

洗浄液：50mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、pH 8.0、0.3M塩化ナトリウム含有。

溶離液：50mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、pH 8.0、3M塩化ナトリウム含有。

【0043】（3）分析方法及び結果

抗体液100マイクロリットルと試料10マイクロリットルとを混合し、8℃で5分間反応させた。また、容量5ミリリットルの注射筒に、ザルトバインドメンブランアドソーバーD5F（Sartobind™ Membrane Adsorber D5F 略名MAD5F、ザルトリウス社製）を結合し、更に該MAD5Fの溶出口に容量100マイクロリットルの導入管を結合した装置を準備した。

【0044】上記注射筒のシリンジを引くことにより、前記混合液80マイクロリットルを導入管内に導入し、次いで、更に注射筒シリンジを引くことにより、洗浄液5ミリリットルを導入管から前記MAD5F内に吸引した後、注射筒シリンジを押して洗浄液を吐出させることによりMAD5Fを洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した。

【0045】ついで、溶離液3ミリリットルを同様に吸引、吐出し、Fab'-POD、AFPとFab'-YS8の免疫複合体を溶出させた。得られた溶出液2ミリリットルに、基質液200マイクロリットルを加え、37℃で10分間反応させ、その蛍光強度を励起波長328nm、

蛍光波長432nmで測定したところ、実施例1の本発明方法-3）と同等の蛍光強度が得られた。以上のことから、ポンプの代わりに注射筒を用いても、同様の結果が得られることが判る。

【0046】実施例4 測定装置

1. 装置構成

装置構成について図5～図7の装置外観図及び図8の配管系統図を用いて説明する。反応ディスク1は、3重のライン構成のターンテーブルであり、内周は試料容器2、中周は抗原抗体反応容器3と溶離液A収納容器4、そして外周は酵素反応セル5が配置されている。試料容器2、抗原抗体反応容器3、溶離液A収納容器4は、クーラユニット27により8℃に保冷されており、酵素反応セル5はヒータユニット28により40℃に温調されている。

【0047】第1のプロープ6を有する分注ユニットは、試料容器2に収納された試料、第1の試薬（R1）8、第2の試薬（R2）9、第3の試薬（R3）10を吸引して反応容器への分注を行う。この第1のプロープ6は、定量シリンジポンプ12と洗浄シリンジポンプ13に配管されており、このシリンジポンプによりプロープの吸引吐出や洗浄が行われる。なお、この配管内はタンク23からの純水で満たされている。洗浄ポット7は、第1のプロープ6の洗浄に用いられる。また第1のプロープ6は、追加試料容器設置部の追加試料11の吸引も行うことができる。

【0048】第2のプロープ14を有する分注ユニットは、抗原抗体反応容器3中の抗原抗体反応液の吸引とカラム18への導入、溶離液A20による洗浄と溶離液A収納容器4への分注、溶離液B21および/または溶離液C22による免疫複合体の溶出および溶出液の酵素反応セル5への分注を行う。この第2のプロープ14は、カラム用シリンジポンプ17に管を介して接続されており、このシリンジポンプ17により各吸引吐出が行われる。この配管内もタンク23からの純水で満たされている。多連バルブ19は、溶離液A/B/Cの変更を行う流路切替弁である。洗剤16は、カラムおよび第2のプロープ14配管内の洗浄に用いられる。また、洗浄ポット15は、第2のプロープ14の洗浄および分析に使用しなかった溶出液の排出に用いられる。

【0049】検出器25は、酵素反応セル4の蛍光強度を測定する蛍光測光部である。検出器25は、反応液に励起光を照射し、反応液から発せられる蛍光量をホトマル（光電子増倍管）にて測定するものである。またホトマルはその蛍光量に応じてゲインを調整できるようになっている。

【0050】排出ノズル26は、分析終了反応液を不図示のポンプにより排水する廃液処理部である。その廃液はドレインタンク24に収納される。純水タンク23は、各プロープおよび配管の洗浄に用いられる純水を収



納している。

【0051】ドレインタンク24は、各プローブや反応液の廃液を収納する。表示器29、キーボード30、プリンター31は、分析の依頼や結果表示および動作の開始などを行う装置制御部である。

## 【0052】2. 分析シーケンス

分析シーケンスは、1つの試料を分析する際に、装置の各ユニット動作の流れを示すものである。すなわち一連の分析動作において、どのタイミングで試料・試薬が分注・反応・測光・排出されるかを示すものである。

### 【0053】(1) 1試薬、2溶離液の場合

前処理として第1の試薬(R1)のみの抗原抗体反応を行い、分析として溶離液Bのみによる免疫複合体の溶出を行う動作をおこなった場合の分析シーケンスを図9に示す。

#### 【0054】1) 準備

分析に使用する試薬、溶離液A/B、純水、洗剤、カラムをセットする。試料容器2を反応ディスク1内周にセットし保冷する。抗原抗体反応容器3および溶離液A収納容器4を、反応ディスク1中周にセットし保冷する。酵素反応セル5を、反応ディスク1外周にセットし40℃に温調する。第1のプローブ6、第2のプローブ14の配管内を、純水により洗浄する。

【0055】2) 装置制御部で分析依頼操作を行ったあと、スタートをかける。

(a) 反応ディスク1が動作し、溶離液A収納容器4が第2のプローブ14のアクセス位置に移動する[AD]。次に第2のプローブ14が、溶離液A収納容器4に溶離液Aを分注する[A]。

(b) 反応ディスク1が動作し、試料容器2が第1のプローブ6のアクセス位置に移動する[SD]。次に第1のプローブ6が試料を吸引する[S]。

【0056】(c) 反応ディスク1が動作し、抗原抗体反応容器2が、第1のプローブ6のアクセス位置に移動する[SD]。次に第1のプローブ6が試料を抗原抗体反応容器3に吐出する[S]。

(d) 反応ディスク1が動作し、抗原抗体反応容器3が、第1のプローブ6のアクセス位置に移動する[SD]。

【0057】(e) 第1のプローブ6が第1の試薬(R1)を吸引し、抗原抗体反応容器3に分注する[R1]。

(f) 抗原抗体反応が始まり、約4.5分間反応が進む。

(g) 反応ディスク1が動作し、抗原抗体反応容器3が、第2のプローブ14のアクセス位置に移動する[ID]。次に第2のプローブ14が、抗原抗体溶液を吸引する[I]。

【0058】(h) 反応ディスク1が動作し、溶離液A収納容器4が、第2のプローブ14のアクセス位置に移動する[AD]。次に第2のプローブ14が溶離液Aを吸引しながら、抗原抗体液をカラム18に導入する

[I]。

(i) 第2のプローブ14が洗浄ポット15のアクセス位置に移動し、溶離液Aでカラム18の洗浄を行う[A液洗浄]。

【0059】(j) 第2のプローブ14が、洗浄ポット15のアクセス位置に移動し、溶離液Bでカラムの洗浄を行う[B液溶出]。

(k) 反応ディスク1が動作し、酵素反応セル5が第2のプローブ14のアクセス位置に移動する[B分画分注D]。次に第2のプローブ14が、酵素反応セル5に免疫複合体の溶出、分取をおこなう[B分画分注]。

【0060】(l) 第2のプローブ14が、洗浄ポット15のアクセス位置に移動し、溶離液Bでカラムの洗浄を行う[B液溶出]。

(m) 反応ディスク1が動作し、酵素反応セル5が、第1のプローブ6のアクセス位置に移動する[R3D]。次に第1のプローブ6が試薬3を吸引し、酵素反応セル5に吐出する[R3]。

【0061】(n) この時点で溶出液の酵素反応が始まる。

(o) 反応ディスク1が動作し、酵素反応セル5が検出器アクセス位置に移動する[測光D]。次に酵素反応セル5の蛍光強度を測定する[測光]。

(p) 蛍光強度の測定は約10分間測定する。

【0062】(q) 蛍光強度の測定中に第2のプローブ14が、洗浄ポット15アクセス位置に移動し、カラム18と第2のプローブ14の洗浄を行う[カラム洗浄]。

(r) 不図示の装置データ処理部により、複数ゲインから得られた各測光データは、その蛍光強度変化が測定可能範囲内に納まっているゲインのデータを選択し、演算され、試料中の測定対象物の濃度を算出する。同時に、結果を表示部およびプリンターに出力する。

【0063】(s) 反応ディスク1が動作し、排出ノズルアクセス位置に移動する[反応液排出D]。

(t) 分析反応終了液は不図示のポンプにより排水される。

以上で、試料の一連の分析動作が終了する。

【0064】この分析シーケンスにおいて、第1の試薬(R1)を第2の試薬(R2)の動作に、溶離液Bを溶離液Cの動作に変更することもできる。また第1の試薬(R1)動作時に第2の試薬(R2)を、溶離液B動作時に溶離液Cを使用しても、またその逆に使用することもできる。

【0065】(2) 2試薬、3溶離液の分析シーケンス  
上記分析シーケンスにおいて、抗体液の第1の試薬(R1)、第2の試薬(R2)および溶離液B、Cの動作を全て盛り込むこともできる。その分析シーケンス例を図11に示す。

【0066】本例では、第1の試薬(R1)分注後1

8. 9分後に第2の試薬(R2)を分注し、その後18. 6分後に反応液のカラム18への導入を行う。そして、溶離液A液洗浄後、溶離液Bによる溶出、溶離液Cによる溶出が引き続き行われ、それぞれの溶出液の酵素反応を測光測定することになる。結果データは、溶離液B、Cによる免疫複合体量についてそれぞれ演算、算出することになる。さらに、2つの結果データを用い、その合計免疫複合体量ならびに各割合も算出することができる。

#### 【0067】3. 動作シーケンス

分析シーケンスを繰り返すことにより、複数の試料を連続的に分析することができる。しかし、分析シーケンスを繰り返すだけでは、一連の分析シーケンスが実行されるのに必要な時間毎に1件の分析結果しか得られない。そこで処理能力を上げるために一つの分析シーケンス中に他の分析シーケンスの動作を更に組み込んで装置を作動させることが一般的に行われている。一つの分析シーケンス中に他の分析シーケンスの動作を組み込んだものは動作シーケンスと呼ばれる。

【0068】本装置の動作シーケンスは、反応ディスクユニットの動作を基本に、他のユニットの動作が占有する時間を基に作製されている。図10や図12に示した動作シーケンスは、一つの分析シーケンス中に他の分析シーケンスの動作を最大限に組み込んだ場合あり、1動作シーケンスを実行するのに要する時間は150秒である。この動作シーケンスを繰り返すことにより、複数の試料を連続的に分析した場合、150秒毎に分析結果が得られる。即ち、このように動作シーケンスを設定することにより、1試薬、2溶離液の分析シーケンス処理の場合で7倍、また、2試薬、3溶離液の分析シーケンス処理の場合で20倍処理能力が上がったことになる。

#### 【0069】4. 動作シーケンスに於ける各ユニットの動作

各ユニットの動作の詳細について以下に説明する。

##### (1) 反応ディスクの動作。

(a) [AD]は、溶離液Aの分注を行うために、溶離液A収納容器4を第2のプロープ14のアクセス位置に移動させる動作を示す。

【0070】(b) [ID]は、抗原抗体反応液の吸引を行うために、抗原抗体反応容器3を第2のプロープ14のアクセス位置に移動させる動作を示す。

(c) [測光]は、測光を行うために、酵素反応セル5を検出器25アクセス位置に移動させる動作を示す。尚、この測光の動作は同一周期(本例では30秒毎)で繰り返される。

【0071】(d) [SD]は、試料を吸引するために、試料容器2を第1のプロープ6のアクセス位置に移動させ、次いで、試料の吐出をおこなうために、抗原抗体反応容器3を第1のプロープ6のアクセス位置に移動させ

る動作を示す。

(e) [R1D]は、第1の試薬(R1)の分注を行うために、抗原抗体反応容器3を第1のプロープ6のアクセス位置に移動させる動作を示す。

【0072】(f) [B分画分注D]および[C分画分注D]は、溶離液Bまたは溶離液Cの溶出液の分注を行うために、酵素反応セル5を第2のプロープ14のアクセス位置に移動させる動作を示す。

(g) [R3D]は、第3の試薬(R3)の分注を行うために、酵素反応セル5を第1のプロープ6のアクセス位置に移動させる動作を示す。

【0073】(h) [R2D]は、第2の試薬(R2)の分注を行うために、抗原抗体反応容器3を第1のプロープ6のアクセス位置に移動させる動作を示す。

(i) [攪拌D]は、液の攪拌を行うために、抗原抗体反応容器3を第1のプロープ6のアクセス位置に移動させる動作を示す。尚、液の混合を要求されない分析では、この動作は選択されない。

(j) [反応液排水D]は、分析終了反応液の排水を行うために、抗原抗体反応容器3を排出ノズル26のアクセス位置に移動する動作を示す。

#### 【0074】(2) 第1のプロープ6の動作

(a) [S]は、試料容器2のアクセス位置に移動し、試料を吸引し、次いで、抗原抗体反応容器3のアクセス位置に移動し、分注を行う動作を示す。また、[S洗浄]で、洗浄ポット7のアクセス位置に移動し、プロープ洗浄を行う動作を示す。

【0075】(b) [R1]は、第1の試薬(R1)のアクセス位置に移動し、試薬を吸引し、次いで抗原抗体反応容器3のアクセス位置に移動し、分注を行う動作を示す。また、[攪拌]は、反応液を吸引吐出し、液の混合攪拌を行う動作を示す。尚、液の混合を要求されない分析ではこの動作は選択されない。更に、[R1洗浄]は、洗浄ポット7のアクセス位置に移動し、プロープ洗浄を行う動作を示す。

【0076】(c) [R2]は、第2の試薬(R2)のアクセス位置に移動し、試薬を吸引し、次いで抗原抗体反応容器3のアクセス位置に移動し、分注を行う動作を示す。また、[攪拌]は、反応液を吸引吐出し、液の混合攪拌を行う動作を示す。但し、液の混合を要求されない分析ではこの動作は選択されない。更に、[R2洗浄]は、洗浄ポット7のアクセス位置に移動し、プロープ洗浄を行う動作を示す。

【0077】(d) [R3]は、第3の試薬(R3)のアクセス位置に移動し、試薬を吸引し、次いで酵素反応セル5のアクセス位置に移動し、分注を行う動作を示す。また、[R3洗浄]は、洗浄ポット7のアクセス位置に移動し、プロープ洗浄を行う動作を示す。

#### 【0078】(3) 第2のプロープ14の動作

(a) [A]は、洗浄ポット15のアクセス位置に移動

し、カラム用シリンジポンプ17で溶離液Aを吸引吐出することにより配管内を溶離液Aに置換し、次いで溶離液A収納容器位置4のアクセス位置に移動し、溶離液Aの分注を行う動作を示す。

【0079】(b) [I]は、抗原抗体反応容器3のアクセス位置に移動し、抗原抗体反応液を吸引し、次いで溶離液A収納容器4のアクセス位置に移動し、次に溶離液Aを吸引しながら、抗原抗体反応液をカラム18へ導入する動作を示す。

(c) [A液洗浄]は、洗浄ポット15のアクセス位置に移動し、カラム用シリンジポンプ17で溶離液Aの吸引吐出を繰り返すことにより、溶離液Aでカラムの洗浄を行う動作を示す。

【0080】(d) [B液溶出]は、洗浄ポット15のアクセス位置に移動し、カラム用シリンジポンプ17で溶離液Bの吸引吐出を繰り返すことにより、溶離液Bでカラムに吸着された免疫複合体の溶出を行う動作を示す。また、[B分画分注]は、酵素反応セル5のアクセス位置に移動し、溶出液の吐出を行う動作を示す。

(e) [C液溶出]は、洗浄ポット15のアクセス位置に移動し、カラム用シリンジポンプ17で溶離液Cの吸引吐出を繰り返すことにより、溶離液Cでカラム結合した免疫複合体の溶出を行う動作を示す。また、[C分画分注]は、酵素反応セル5のアクセス位置に移動し、溶出液の吐出を行う動作を示す。

【0081】(f) [カラム洗浄]は、洗浄ポット15のアクセス位置に移動し、カラム用シリンジポンプ17で純水の吸引吐出を繰り返すことにより、カラム18および第2のプロープ14の洗浄を行った後、洗剤16のアクセス位置に移動し、洗剤16を吸引しカラム18まで導入し、次いで洗浄ポット15のアクセス位置に移動し、再度カラムシリンジポンプ17が純水を吸引吐出を繰り返すことにより、洗剤の洗浄を行う動作を示す。

【0082】(4) 排出ノズル26の動作

(a) [反応液排水]は、排出ノズル26のアクセス位置に移動してきた抗原抗体反応容器3に排出ノズルを挿入し、分析終了反応液の排水を行う動作を示す。

【0083】(5) 検出器25の動作

(a) [測光]は、検出器25のアクセス位置に移動してきた酵素反応セル5の蛍光測光を行う動作を示す。尚、この[測光]は、酵素反応中の酵素反応セル5の連続的測光を1回とし、同一間隔で1サイクル中に5回(本例では30秒毎)繰り返される。

【0084】5. 注記

本説明中の各ユニットの動作時間、反応時間、試料容器や各種反応容器の数量、各溶液の吸引吐出量、設定温度、分析シーケンス及び動作シーケンス等は本内容に限定されるものでなく、種々変更することができるのは勿論である。

【0085】実施例5. AFPの測定

(1) 使用装置

実施例4の装置を使用した。

【0086】(2) 使用した試薬類の調製

① 抗体液

実施例1と同じ抗体液を使用し、実施例4の装置の第1の試薬(R1)の位置にセットした。

② 試料

AFP濃度420ng/mlのヒト血清を生理食塩水で1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、9/10倍に稀釈し、これを試料とした。またAFP濃度100ng/mlの標準品(和光純薬工業社製)を標準液として用いた。

【0087】③ 基質液

実施例1と同じ基質液を使用し、実施例4の装置の第3の試薬(R3)の位置にセットした。

④ 溶離液

溶離液A: 50mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(pH8.0、0.3M塩化ナトリウム含有)

溶離液B: 50mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(pH8.0、3.0M塩化ナトリウム含有)

これらの2つを溶離液とし、実施例4の装置の溶離液A、溶離液Bの位置に夫々セットした。

【0088】(3) 分析方法

実施例4の分析シーケンス1(1試薬、2溶離液)を用いて、以下の分析条件で分析し、各試料について1分間あたりの蛍光強度の変化を測定した。得られた測定値とAFP標準液の測定値との比較から各試料中のAFP濃度を算出した。尚、各試料について5回づつ測定を行った。

【0089】試薬1: 100 $\mu$ l

試料: 3 $\mu$ l

抗原抗体反応液カラム導入量: 20 $\mu$ l

基質量: 100 $\mu$ l

分画量: 1ml

カラム洗浄液量: 18 ml

カラム: POROSE-DEAEカラム(5.5 x 6.9 mm)

【0090】結果

稀釈倍率と測定値との関係を図13に示す。図13から明らかな如く原点を通る良好な直線関係となることが判る。また、各試料について測定値の変動係数を求めたところ0.8%~6.0%と良好な値であった。

【0091】実施例6. 糖鎖構造の異なるAFPの分別測定

(1) 使用装置

実施例4の装置を使用した。

【0092】(2) 使用した試薬類の調製

① 第1の試薬

レンズマメレクチン(LCA、(株)ホーネンコーポレーション社製)10mg/10ミリリットルと、5個の硫酸残基を有する硫酸化チロシンペプチド[Ala-(Tyr(SO<sub>3</sub>)<sub>5</sub>)]が結合した抗 $\alpha$ -フェトプロテイン抗体Fab'フラグメント(Fab'-YS5、和光純薬工業(株)製)を1.75 nmol/1

0ミリリットルとを含有する50mM N<sup>-</sup>-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸 (ACES) 緩衝液 (pH6.5) を調製し、これを第1の試薬とし、実施例4の装置の第1の試薬 (R1) の位置にセットした。

#### 【0093】② 第2の試薬

上記Fab'-YS5と認識部位が違ふことを確認したペルオキシダーゼ標識抗 $\alpha$ -フェトプロテイン抗体Fab'フラグメント (Fab'-POD、和光純薬工業 (株) 製) 402pmol/1ミリリッターと、Fab'-YS5、Fab'-PODと認識部位が違ふことを確認した抗 $\alpha$ -フェトプロテイン抗体のFab'フラグメントに8個の硫酸残基を有する硫酸化チロシンペプチド [Ala-(Tyr(SO<sub>3</sub>)<sub>8</sub>)] が結合したもの (Fab'-YS8、和光純薬工業 (株) 製) 72 pmol/1ミリリッターとを含有する50mM ACES緩衝液 (pH6.5) を調製し、これを第2の試薬とし、実施例4装置の第2の試薬 (R2) の位置にセットした。

【0094】尚、Fab'-YS8を作製するために用いられた抗体は、LCAが結合していないAFPにのみ結合する性質を有している。これに対して、Fab'-YS5 及びFab'-PODを作製するために用いられた抗体は、LCAの結合の有無に拘わらず全てのAFPに結合する性質を有している。

#### 【0095】③ 試料

AFP濃度690ng/mlで、AFP-L3分画比 (%) が46%のヒト血清を生理食塩水で1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10、9/10倍に希釈したものを試料とした。また、AFP濃度200ng/mlで、AFP-L3分画比 (%) が0%の標準品、及びAFP濃度200ng/mlで、AFP-L3分画比 (%) が100%の標準品 (何れも和光純薬工業 (株) 社製) を標準液として用い検量線を作製した。

#### ④ 基質液

実施例1と同じ基質液を使用し、実施例4の装置の第3の試薬 (R3) の位置にセットした。

#### 【0096】⑤ 溶離液

溶離液A: 50mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH8.0、0.3M塩化ナトリウム含有)

溶離液B: 50mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH8.0、0.78M塩化ナトリウム含有)

溶離液C: 50mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH8.0、3.0M塩化ナトリウム含有)

これらの3つを溶離液とし、夫々を実施例4の装置の溶離液A、溶離液B及び溶離液Cの位置にセットした。

#### 【0097】(3) 分析方法

実施例4の分析シーケンス2 (2試薬、3溶離液) を用いて、以下の分析条件で分析した。尚、溶離液Bで免疫複合体1 (Fab'-POD-AFP-Fab'-YS5) がカラムから溶出され、溶離液Cで免疫複合体2 (Fab'-POD-AFP-Fab'-YS8-Fab'YS5) がカラムから溶出される。得られた免疫複合体1分画と免疫複合体2分画の夫々について1分間あたりの蛍光強度の変化を測定し、得られた夫々の

測定値の合計と、AFP標準液の測定値から各試料中のAFP濃度を算出した。

【0098】また、免疫複合体1分画についての測定値と免疫複合体2分画についての測定値とを下記式に代入して各試料の分画比 (%) を求め、これを、予めL3分画比0%の標準液とL3分画比100%のAFP標準液とを用いて同様にして得られた分画比を用いて作製した検量線に当てはめ、各試料中のAFP-L3分画比 (%) を求めた。

【0099】分画比 (%) = 免疫複合体1分画の測定値 / (免疫複合体1分画の測定値 + 免疫複合体2分画の測定値)

【0100】第1の試薬: 100 $\mu$ l

第2の試薬: 10 $\mu$ l

試料: 10 $\mu$ l

抗原抗体反応液カラム導入量: 80 $\mu$ l

基質量: 100 $\mu$ l

免疫複合体1分画量: 1 ml

免疫複合体2分画量: 1 ml

カラム洗浄液量: 18 ml

カラム: POROSE-DEAEカラム (5.5 x 6.9 mm)

#### 【0101】結果

希釈倍率と測定値との関係を図14に示す。図14から明らかな如く、AFP濃度は原点を通る良好な直線関係となることが判る。また、AFP-L3分画比 (%) は試料を希釈しても変化しないことが判る。これは、特定のレクチンと反応する (特定の糖鎖構造を有する) AFPの割合は試料を希釈しても変化しないためである。

#### 【0102】

【発明の効果】本発明は、多数回分離しても、分離器具内の圧力が上昇したり、分離が悪くなる現象を避けることができるので、分離器具内の寿命が著しく向上すると共にキャリーオーバーが生じないという従来技術では解決できなかった課題を解決したものであり、それ故極めて画期的な発明である。また、ポンプを使用して加圧溶出する場合、本発明によれば、溶出先端の解放端から試料を導入するので、特殊な試料導入装置を必要としない利点が得られる。

#### 【0103】

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の分離装置を示す概略図である。

【図2】従来の分離装置を示す概略図である。

【図3】実施例1の蛍光強度の測定結果を示す棒グラフである。

【図4】実施例2のカラム圧力の変動の測定結果を示す折れ線グラフである。

【図5】本発明の分離装置の実施例を示す一部切欠平面図である。

【図6】本発明の分離装置の実施例を示す正面図である。

【図7】本発明の分離装置の実施例を示す側面図である。

【図8】本発明の分離装置の実施例を示す配管系統図である。

【図9】1試薬、2溶離液の場合の本発明の分離装置の分析シーケンスを示すものである。

【図10】1試薬、2溶離液の場合の本発明の分離装置の動作シーケンスを示すものである。

【図11】2試薬、3溶離液の場合の本発明の分離装置の分析シーケンスを示すものである。

【図12】2試薬、3溶離液の場合の本発明の分離装置の動作シーケンスを示すものである。

【図13】実施例5による希釈倍率とAFP濃度測定値との関係を示す検量線図である。

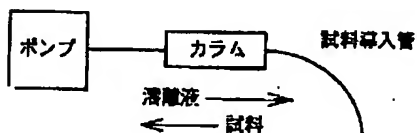
【図14】実施例6による希釈倍率とAFP濃度測定値との関係を示す検量線図並びに希釈倍率とAFP-L3分画比(%)との関係を示す検量線図である。

【符号の説明】

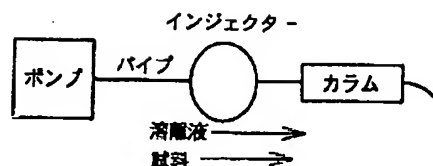
- |   |          |
|---|----------|
| 1 | 反応ディスク   |
| 2 | 試料容器     |
| 3 | 抗原抗体反応容器 |
| 4 | 溶離液A収納容器 |
| 5 | 酵素反応セル   |
| 6 | 第1のプロープ  |
| 7 | 洗浄ポット    |

- |    |                |
|----|----------------|
| 8  | 第1の試薬R1(抗体液)   |
| 9  | 第2の試薬R2(抗体液)   |
| 10 | 第3の試薬R3(蛍光基質液) |
| 11 | 追加試料           |
| 12 | 定量シリンジポンプ      |
| 13 | 洗浄シリンジポンプ      |
| 14 | 第2のプロープ        |
| 15 | 洗浄ポット          |
| 16 | 洗剤             |
| 17 | カラムシリンジポンプ     |
| 18 | カラム            |
| 19 | 多連バルブ          |
| 20 | 溶離液A           |
| 21 | 溶離液B           |
| 22 | 溶離液C           |
| 23 | 純水タンク          |
| 24 | ドレインタンク        |
| 25 | 検出器            |
| 26 | 排出ノズル          |
| 27 | クーラーユニット       |
| 28 | ヒータユニット        |
| 29 | 表示器            |
| 30 | キーボード          |
| 31 | プリンター          |

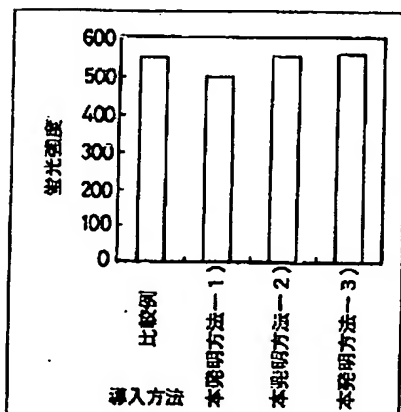
【図1】



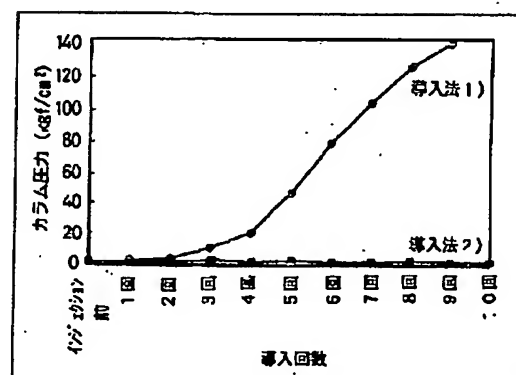
【図2】



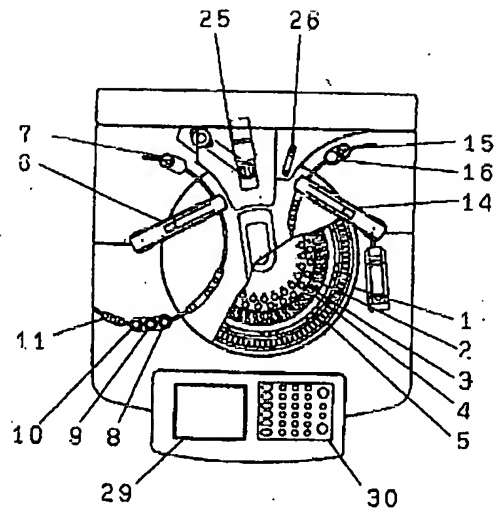
【図3】



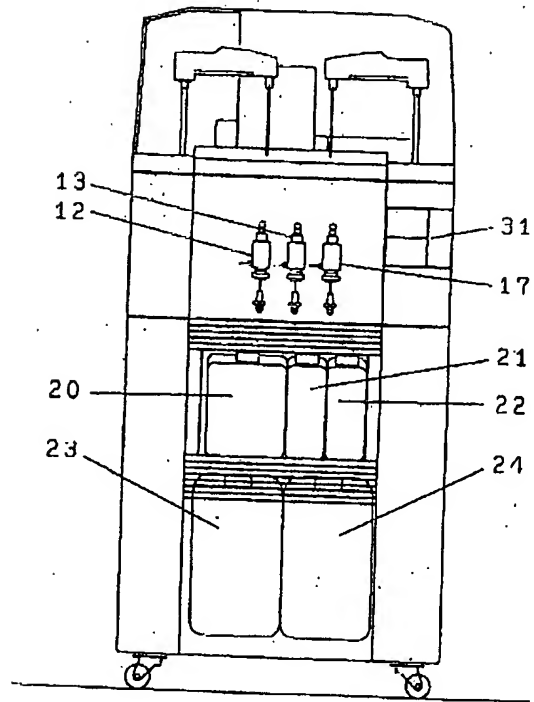
【図4】



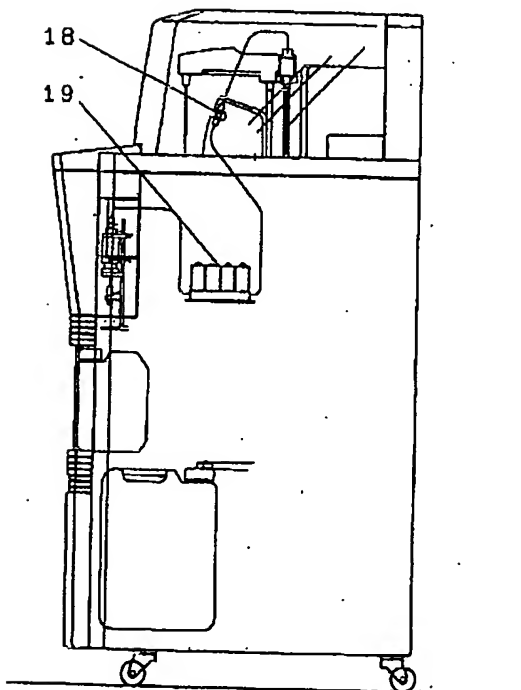
【図5】



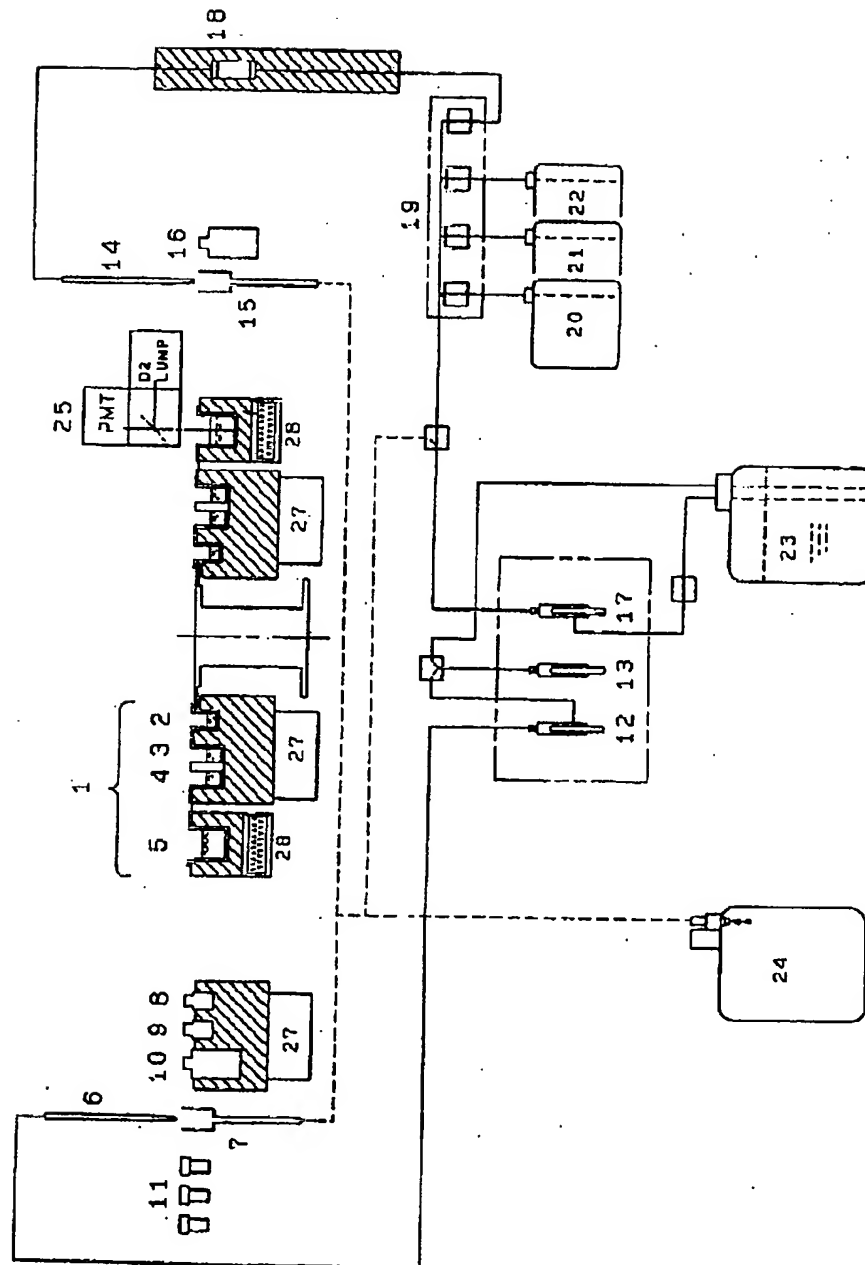
【図6】



【図7】



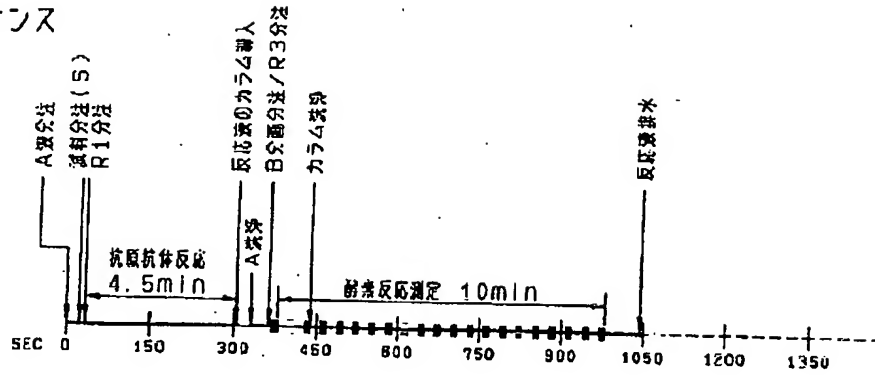
【図8】





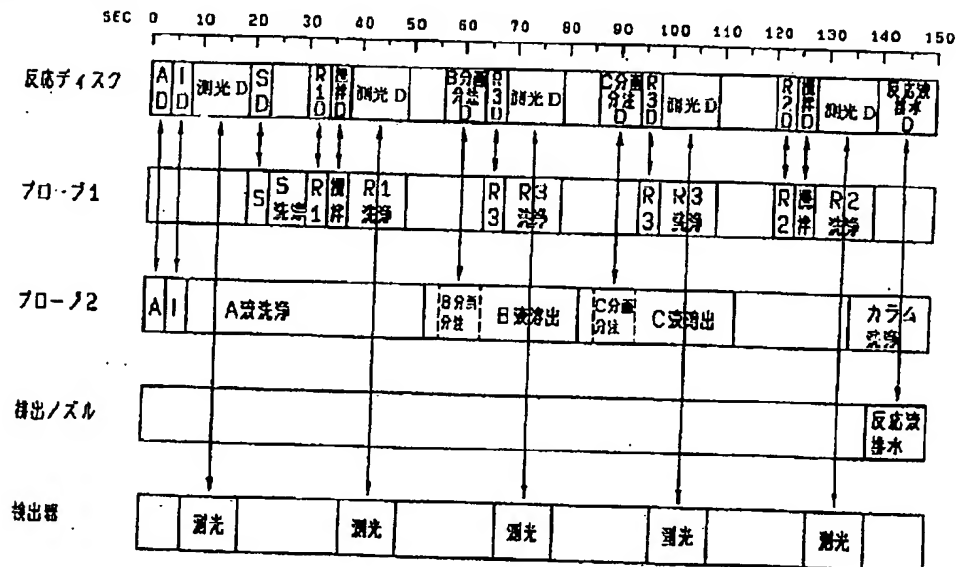
【図9】

## 分析シーケンス



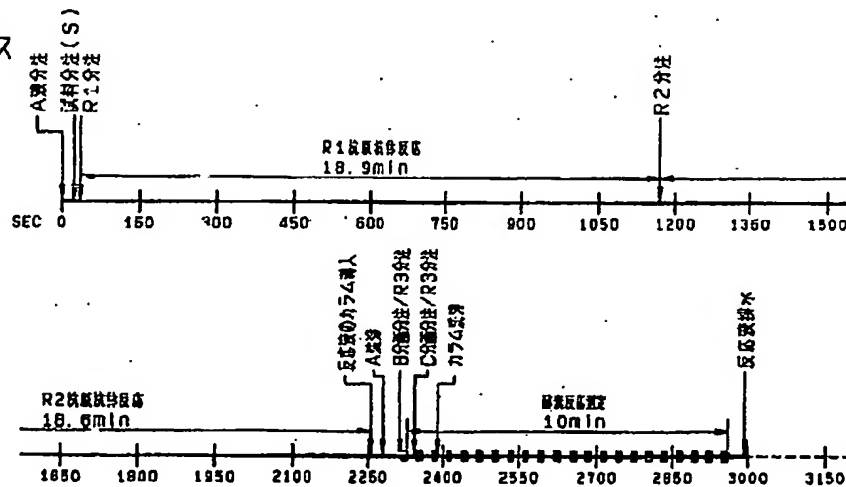
【図10】

## 動作シーケンス



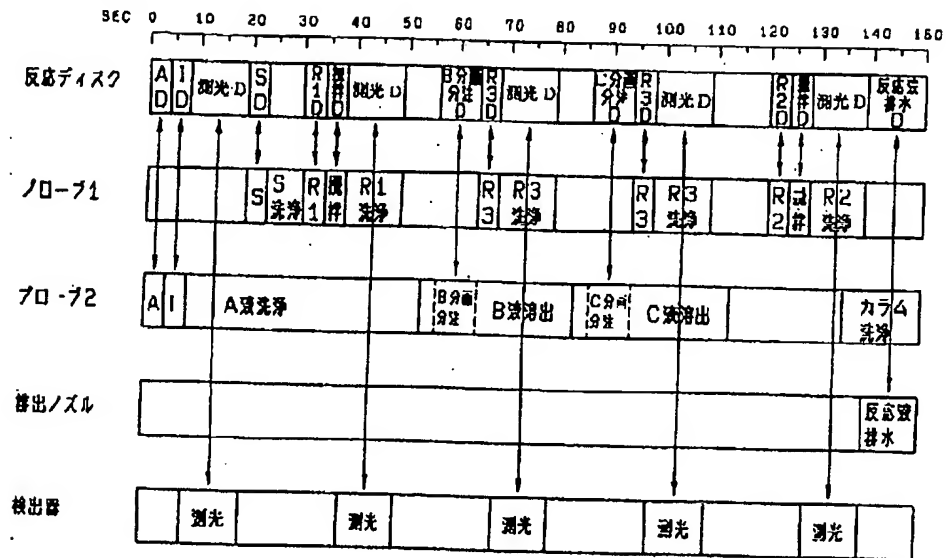
【図11】

## 分析シーケンス

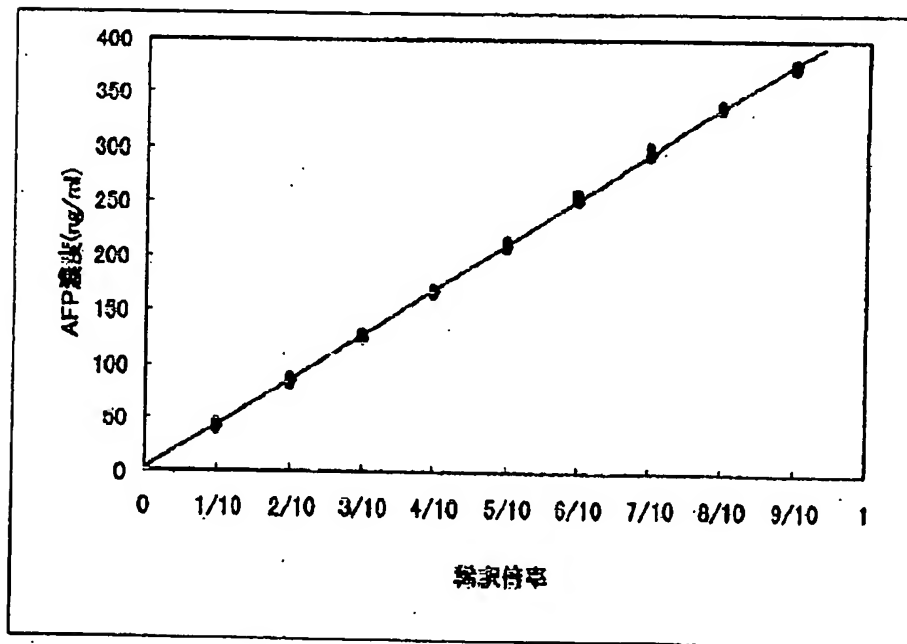


【図12】

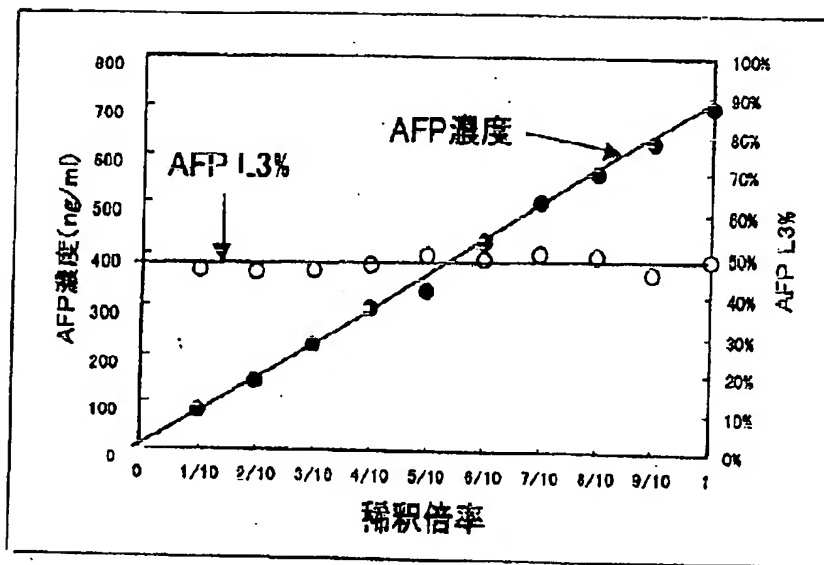
## 動作シーケンス



【図13】



【図14】



フロントページの続き

(72)発明者 林 正佳

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
株式会社島津製作所三条工場内

(72)発明者 荒島 秀嘉

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
株式会社島津製作所三条工場内

(72)発明者 奥山 哲史

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
株式会社島津製作所三条工場内

(72)発明者 花房 信博

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
株式会社島津製作所三条工場内

(72)発明者 谷水 弘治

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
株式会社島津製作所三条工場内